云 南 植 物 研 究6（4）：441—445，1984
Acta Botanica Yunnanica

云南山茶雄配子体发育过程中三磷酸腺苷酶及酸性磷酸酶细胞化学定位*

刘 成 运

（中国科学院昆明植物研究所）

摘 要 人工培养的云南山茶（*Camellia reticulata* Lindl.）雄配子体发育的不同时期，在花粉管，营养核及生殖细胞内三磷酸腺苷酶和酸性磷酸酶的相对活性各不相同。萌发初期，花粉粒内三磷酸腺苷酶的反应特别地强烈，而酸性磷酸酶的活性仅显示在花粉粒内壁及萌发孔周围。当萌发后，在花粉管内强烈地显示了这两种酶的活性，特别是顶端生长区。当营养核及生殖细胞进入花粉管后，酶的活性随它们在管内向端运动的速度而变化。在贴合期，在二者接触膜上显示出较明显的酶的活性。精子形成以后，营养核酶的活性降低。

三磷酸腺苷酶（简称ATP酶）及酸性磷酸酶是高等植物体细胞中普遍存在的一些酶类，对于各种组织器官的运动，物质运输以及细胞内物质的合成和分解等代谢活动中能量的贮存和供应，以及大分子物质的水解具有很重要的功能。有关这方面的研究，近十多年来已积累了大量的资料[2,5,8,10]。然而，关于雄配子体及雄配子在发育过程中这些能量转换酶及水解酶类的动态变化及其特定的生理功能的资料是缺乏的。我国唐佩华曾对君子兰（*Clivia nobilis*）雄配子体发育过程中ATP酶的动态进行了一些研究，并且提出营养核在整个雄配子体发育过程中，特别是在精子形成过程中是一个有充分能量供应，能够完成其特定生理功能的结构[2]。作者曾对云南山茶人工培养的花粉粒，在其发育过程中几种重要的生命组成物质：多糖、DNA 和组蛋白等进行了细胞化学定位的观察[1]。同时对山茶在雄配子体发育过程中ATP 酶及酸性磷酸酶也进行了一些细胞化学定位，以期通过对不同科属高等植物生殖细胞内这些生理活性物质的动态研究，为进一步了解花粉管中生殖细胞与营养核之间的关系提供参考。

材 料 和 方 法

本研究所用山茶材料和人工培养方法与上文同[1]。在不同发育时期取样进行酶的细胞化学反应。

ATP酶采用Wachstein-Meisel法[12]。材料经冷 3 %戊二醛（用0.05M二甲砷酸钠缓

本文于1984年 3 月19日收到。

＊本研究所用山茶材料由本所夏丽芳同志赠送，特致衷心感谢。

冲液pH7.2配制）或用80%酒精暂短固定[2]。前者用同一缓冲液轻洗数次，后者经40%酒精进入蒸馏水内。然后进行ATP酶反应。

酸性磷酸酶采用二种方法。一种是通常采用的β-甘油磷酸酶（β-Glycerophosphatase）简称为β-GPase。另一种是近年来经常被采用的对位-硝基苯基磷酸酶（Para-nitrophenylphosphatase）简称为P-NPPase。β-GPase采用Barka and Anderson（1962）法[3]，P-NPPase采用Ryder and Bowen（1975）法[9]。对照均采用不加底物的方法。

实 验 结 果

1.三磷酸腺苷酶 山茶花粉粒经2—3小时的培养后开始萌发。凡有萌发力的花粉粒开始产生明显的酶的活性，整个花粉粒外壁以及内部细胞均呈现出深黑色酶的活性反应物，而无萌发力的花粉粒只有萌发孔处有少量酶的反应。由于花粉粒酶反应强烈，内面生殖细胞及营养核的酶活性就不易观察到。当花粉管萌发伸出萌发孔后，花粉管的顶部区域呈现出深黑色活性反应，而其余部分只有沿花粉管壁内侧的细胞质膜部位具有酶的活性反应。萌发5—6小时后，营养核开始首先进入花粉管，并以比较长的时间到达花粉管的顶端区域，整个营养核呈现出深黑色活性反应（图版Ⅰ,1）。10小时以后，大部分生殖细胞进入花粉管，同时以比营养核较快的速度向顶端区域移动，在较短的时间内接近营养核，但具体的移动速度未进行测定。在移动过程中生殖细胞酶的活性接近营养核（图版Ⅰ,2）。当生殖细胞与营养核接近时，移动速度开始减慢，而酶活性也随之降低（图版Ⅰ,3）。此时营养核酶的活性明显地高于生殖细胞。进一步生殖细胞的细胞膜与营养核之核膜靠拢，有的作者称之为相互贴合期[2]。这一过程是雄配子体发育过程中生殖细胞与营养核之间关系最密切时期。可观察到生殖细胞在贴合期酶的活性与营养核酶活性的水平接近，同时在膜的交介面上显示出更明显的酶的活性反应带。对于膜上酶的微细分布是无法在光学显微镜下观察到的，这有待于进一步从超微结构水平来确定。

从花粉粒萌发至生殖细胞与营养核贴合期这一系列发育期间，花粉粒酶的活性反应一直处于很高的状态（图版Ⅰ,1—4）。同时花粉管内沿质膜的部位亦呈现出酶的活性反应。我们还可以在某些花粉管内所形成的胼胝质拴塞中发现少量的活性物（图版Ⅰ,8）。以上这些现象反映了在花粉管伸长，同时在管端进行一系列发育变化期间，花粉粒仍然起着一定的作用，推测某些来自花粉粒的可塑性物质仍然可以通过拴塞被输送到管端。但这方面尚缺乏必要的实验依据。

生殖细胞与营养核贴合后，互相分开，生殖细胞开始进入有丝分裂，并形成两个精细胞(图版Ⅰ,6—7)。有关有丝分裂的过程在前文中已描述[1]。两精细胞形成后，营养核酶的活性开始下降，只有核及核仁处尚明显，而花粉粒及花粉管内酶的活性已大为降低（图版Ⅰ, 7）。

2.酸性磷酸酶 本文采用二种水解酶反应，从反应生成物的分布和显色深度看，二者没有很明显的差别。山茶花粉粒酸性磷酸酶的活性反应不如ATP酶反应明显。主要分布在花粉粒的萌发孔周围以及内壁之上，而花粉粒其余部位酶的活性较弱（图版Ⅱ，10

—11)。无萌发力的花粉粒酶的活性更弱，只内壁部分有少量的反应。当花粉粒萌发后，刚伸出的花粉管中酶的活性很高，特别是顶端具有浓稠细胞质的部分。当营养核及生殖细胞进入花粉管后，生殖细胞所显示的酶的活性要明显地高于营养核(图版Ⅱ，11—12)，这一结果与 ATP 酶相反。当两者靠近以后，酶的活性逐渐接近，但生殖细胞酶的活性仍然要高于营养核（图版Ⅱ，13—15）。在图版Ⅱ，15中，我们可以清晰地观察到一个完整的生殖细胞的结构，一个大的核以及核的中心具有高度酶活性的核仁。核的四周呈椭圆状的细胞质，其酶的活性稍低。在生殖细胞与相邻的营养核之间，有一黑色的酶活性的反应带，它把二个核联系了起来（箭头所示）。这清楚地显示了在贴合过程中双方存在着物质交换的可能性。当两精子形成以后，营养核酶的活性已明显地降低，而两精子的酶活性也低于生殖细胞核和营养核的活性（图版Ⅱ，16—17）。

讨　论

1.关于雄配子体发育过程中酶的细胞化学研究，在光学方面主要是对一些不同科属植物的花粉粒壁内不同水解酶类进行的少量的研究，如酸性及碱性磷酸酶，核糖核酸酶，酯酶和淀粉酶[6]，研究结果指出，水解酶类主要分布在花粉粒纤维素质内壁中，特别是分布在萌发孔四周，无萌发孔者分布在内壁中部。在萌发孔处，内壁变厚，形成一个环状穿入到萌发孔内。我们对山茶花粉粒酸性磷酸酶在花粉壁内分布的观察结果，与所报道的是一致的。这些水解酶类极易与水结合而释放出来，它在花粉萌发时以及花粉管伸长期，对于某些大分子有机物质的水解，促进花粉萌发和花粉管伸长时营养物质的供应是具有明显的生理功能的。

在超微结构方面，通过对甜樱桃（*Prunus avium*)的花粉管中酸性磷酸酶的定位，证实了这些酶主要分布在花粉管顶端具有许多小泡囊的生长区，在这个约30微米长的区域内，酶主要结合在小的液泡，内质网系统，原生质膜和细胞核中[7]。这同在山茶花粉管中主要分布在花粉管顶端区域，质膜部位以及核内是一致的。酸性磷酸酶在花粉管顶端区域的分布与水解细胞质内大分子有机物质为生殖细胞核的分裂提供物质营养，同时也为在自然条件下，花粉管伸进柱头和花柱起着重要的生理作用。

2.在雄配子发育过程中有关ATP 酶的研究，除唐佩华对君子兰的研究报道外[2]，尚未见到其他有关的报道。作者通过对山茶花粉管发育过程中 ATP 酶的定位，发现生殖细胞与营养核之间所显示的酶活性的动态与在君子兰中所观察到的结果很相似。萌发早期当花粉管中营养核以比较均匀的速度向管端运动时，自始至终酶的活性也比较一致，而不象在生殖细胞内，当在较短的时间内向管端移动时，酶的活性较高，而当接近营养核时，酶的活性也因速度减缓而下降。当与营养核贴合时，由于发生物质的交换活动，酶的活性又有所升高，或营养核的酶活性有所下降，在两者相接触的膜面上，则显示出比其他部位要明显的酶活性。这一变化过程，证实了ATP 酶在雄配子体发育的不同时期，其活性的高低与生殖细胞和营养核在管内移动的速度以及两者本身代谢强度的高低成正相关。因为高的机械运动速度和物质交换都需要大量能量，而 ATP 酶正是ATP转移过程中的偶联因子。通过ATP酶的定位，进一步在山茶科植物雄配子体发育

过程中对于ATP酶在生殖细胞的向端运动和营养核对精细胞形成过程中能量的转移等方面所具有的生理功能得到了进一步的证实。

参 考 文 献

〔1〕 刘成运，1984，云南山茶雄配子体发育过程中多糖、DNA及组蛋白的细胞化学定位。云南植物研究，6(3)：305—310。

〔2〕 唐佩华，1979，在人工培养条件下君子兰（*Clivia nobilis*）等雄配子体发育过程中营养核与生殖细胞的动态。Ⅱ.三磷酸腺苷酶的细胞化学观察。植物学报，21(2)：107—116。

〔3〕 Barka, T. and P. J. Anderson, 1962: Histochemical methods for acid phosphatase using nexazonium pararosanalin as coupler. *J. Histo. Cyto.*, 10: 741—753.

〔4〕 Doll, S. and R. Hauer, 1981: Determination of the membrane potential of vacuoles is lated from red-beet storage tissue. Evidence fir an electrogenic ATPase. *Planta*, 152: 153—158。

〔5〕 Evert, R. F., 1977: Phloem structure and histochemistry. *Annual Review of Plant Physiology*, 28: 199—222.

〔6〕 Knox, R. B., and J. Heslop-Harrison, 1969: Cytochemial localization of enzymes in the wall of the pollen grain. *Nature*, 223 (5): 92—94.

〔7〕 Lin, J., W. J. Uwate, and V. Stallman, 1977: Ultrastructural localization of acid phosphatase in the Pollen tube of *Prunus avium* L. (Sweet cherry). *Planta*, 135: 183—190.

〔8〕 Oparka, K. J., R. P. C. Johnson and I. D. Bowen, 1981: Sites of acid phosphatase in the differentating root protophloen of *Nymphoiaes peltata* (S. G. Gmer.) O. Kuntze. Support for the role of stacked ER in sieve-element autolysis. *Plant, Cell and Environment.*, 4: 27—35。

〔9〕 Ryder, T. A. and I. D. Bowen, 1975: A method for the fine structural localization of acid phosphatase activity using P-nitrophenylphosphate as substrate. *J. Histo. Cyto.*, 23: 235—237.

〔10〕 Schmitz, K. and R. Kuhn, 1982: Fine structure, distribution and frequency of plasmodesmata and pits in the cortex of *Laminaria hyperborea* and *L. Saccharina*. *Planta*, 154: 385—392.

〔11〕 Venema, G., and A. Koopmans, 1962: A phase-contrast microscopic study of pollen grain germination, nuclear movement and pollentube mitosis in *Tradescantia verginiana*. *Cytologia* 27 (1): 11—24.

CYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF ADENOSINE TRIPHOSPHATASE AND PHOSPHATASE WITHIN DEVELOPING MALE GAMETOPHYTE OF CAMELLIA RETICULATA

Liu Chengyun

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*)

Abstract The relative activity of ATPase, β-GPase and P-NPPase were different in the pollen tube, vegetative nucleus and generative cell at various

stages of developing gametophyte of *Camellia reticulata* Lindl. in vitro. The ATPase activity was particularly intense in the pollen grain, while the activity of β-GPase and P-NPPase were only localized on the intine and around the germinal aperture at the initial stage of the germination. After the germination, the activity of both enzymes were show intensely in the tube and top growth region in particular. The change of enzymes activity was positively paralleled with the movement speed of vegetative nucleus and generative cell moving to the top of tube after the entering of the vegetative nucleus and generative cell into the tube. As the sticking of vegetative nucleus with generative cell, an evident of enzymes activity was occured on the contact areas of membrane. The enzymes activity of vegetative nucleus was reduced after the sparms formation.

Explantion of plates

Legends : P-Pollen grain; G-Generative cell; V-Vegetative nucleus; S-Sperm; T-Pollen tube; CP-Callose plug.

Plate Ⅰ

1—9 ATPase. 1. At the initial stage of pollen grain germination, showing the activity of ATPase were intense in the pollen wall, vegetative nucleus and top of tube×600. 2. Showing the generative cell was moving×400. 3. The generative cell approached the vegetative nucleus, the speed of movement slow up×10000. 4. Sticking stage, showing activity of ATPase on the contact areas of membrane×600. 5. Enlarged parts of Fig. 4 ×1200. 6. The formation of two sperms×1000. 7. Showing activity of sperm cells, vegetative nucleus and pollen grain×600. 8. Showing callese plug in pollen tube and less enzymse activity×1000. 9. The contrast of the ATPase×400.

Plate Ⅱ

10, 13, 14, 16, 17. P-NPPase; 11, 12, 15, 18. β-GPase. 10. The contrast of which both pollen enzymes activity have ability for germination and without for one×400. 11. The contrast of enzymes activity in the pollen grain, pollen tube, vegetative nucleus and generative cell×400. 12. The enzymes activity of generative cell which is moving is higher than the vegetative nucleus×1200. 13. The generative cell approached the vegetative nucleus×600. 14. Enlarged parts of Fig. 13×1600. 15. Sticking of generative cell and vegetative nucleus closely to each other×1200. 16. The enzyme activity of vegetative nucleus is the less at the top of tub×400. 17. The formation of two sperms, showing the enzymes activity hagher than vegetative nucleus×1000. 18. The contrast of the β-GPase×400.